云 南 植 物 研 究 2001, 23 (1): 91~96
Acta Botanica Yunnanica

植物离体茎段嫁接*

卢善发
(中国科学院植物研究所，北京 100093)

摘要：植物离体茎段嫁接系统是在无菌条件下将茎切段嫁接后放入培养基中，使接穗和砧木分别与含不同成分的培养基接触，再置光下培养的一个模拟植物正常生理过程、环境条件可控的实验系统。离体茎段嫁接体的发育与整体类似，包括接穗与砧木粘连、愈伤组织产生、次生胞间连丝形成和维管束分化等几个步骤，发育进程受植物激素如生长素和细胞分裂素调节。该系统的建立为阐明嫁接体发育机理及嫁接亲和性机制提供了重要的依据。

关键词：离体茎段嫁接；植物激素；维管组织
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700(2001)01-0091-06

The Grafting of Excised Hypocotyl Segment of Plant in Sterile Culture

LU Shan-Fa
(*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093, China)

Abstract: The grafting of excised hypocotyl segment of plant in sterile culture is described in which two explanted internodes are grafted together in sterile culture and then inserted between two agar surfaces and incubated under light. It imitates the normal physiological process, and is a controllable experimental system. Development of the graft union is similar to that observed in whole-plant graft unions, including a sequence of several distinct steps: initial cohesion of stock and scion; proliferation of callus at graft interface; symplastic interconnection of individual cells of graft partners by secondarily formed plasmodesmata; and vascular bridge formation. The process of development is regulated by plant hormones such as auxin and cytokinin. Clearly this system can be used as a powerful tool in demonstrating the mechanisms of graft formation and graft compatibility.

Key words: Explanted internode grafting; Plant hormones; Vascular tissue

植物嫁接历史悠久。作为一项农业生产技术，它已成为一种常规的无性繁殖手段，在林木、果树、蔬菜、花卉生产等众多方面发挥愈来愈重要的作用；作为一个基础理论研究的理想系统，嫁接技术已用于细胞识别机制（Moore, 1984; Jefree & Yeoman, 1983; Yeoman 等, 1978）、物质运输（Xoconostle-Cazares 等, 1999）、信息传递（McGurl 等, 1994; Palauqui & Vaucheret, 1998; Palauqui 等, 1997; 卢善发和杨世杰, 1995a, b; 1996）、病毒侵染途径（Wilson & Jones, 1992; Wintermantel 等, 1997; Derrick & Barker, 1997）和开花

* 基金项目：国家自然科学基金课题 (39700011)
收稿日期：1999-10-24, 2000-01-24 接受发表

机理（Larkin 等，1990）等重大理论问题的研究。嫁接体的发育，既不是无性杂交，也不是接穗和砧木的机械愈合，而是不同植物或同一植物的器官、组织或细胞相互影响、相互作用结合成为一个有机整体的过程。对这一过程开展深入细致的研究，不仅有重要的理论意义，还具广泛的应用前景。

对嫁接基础理论，自本世纪初开始至今，特别是 70、80 年代，进行了大量研究，相继提出一系列假说，试图解释嫁接的生物学实质、亲和性机制以及一些其它理论问题。众说纷纭，意见不一。这一方面由于嫁接体发育是一个非常复杂的生物学过程，另一方面与研究不够深入有密切关系。薄弱的基础理论使 1〕在寻找合适的砧木时，往往要用可能的砧木一个一个地试验，费时费工；2〕由于嫁接的不亲和性如后期不亲和现象导致某一大树或成片果树突然死亡，造成巨大的经济损失（Hartmann & Kester，1983）；3〕难以找到有效的克服不亲和的方法，限制了嫁接技术的应用范围。

造成嫁接理论研究不够深入的一个主要原因是缺乏理想的研究系统。过去的研究多在整体条件下进行，嫁接后环境条件难以控制，而环境条件的变化，对嫁接组合的发育影响较大，给进一步研究带来很大困难。为此 Parkinson 和 Yeoman（1982）首先建立了离体茎段嫁接系统。该系统的建立及随后的研究，为阐明嫁接体发育机理奠定了重要基础。

1 离体茎段嫁接方法

植物离体茎段嫁接的方法是 Parkinson 和 Yeoman 于 1982 年首先提出的。他们模拟植物正常的生理过程，将嫁接体的接穗和砧木分别与含有不同成分的培养基接触，从而提供了一个可控的实验系统。嫁接时，先切取适当粗细的茎段，用石蜡将切口封住，进行常规消毒，再将带有蜡的茎端切去，按需要将茎段拼接在一起，用透明塑料管固定住接口。然后平放在培养皿中，使砧木基部和接穗顶端分别置于同一个培养皿的不同培养基中（图 1）。最后封闭培养皿，将其置于光照下培养。与常规的整体嫁接相比，离体茎段嫁接系统有许多优点：无菌；嫁接体的发育不受枝、叶和根的影响，可更精确地研究嫁接体的发育过程；可方便地改变培养基成分和培养条件，研究各种理化因子在嫁接体发育过程中的作用，从而提供了一个研究嫁接体发育及嫁接亲和性机制的新系统。

不过，Parkinson 和 Yeoman 所述的方法较为繁锁，因材料消毒不彻底还会造成大量污染，污染率往往达 30% ~ 40%，严重影响了进一步研究。再者，当砧木和接穗茎段粗细相差较大时，用塑料管难以固定嫁接接合部，影响嫁接体发育。因此，我们对实验材料和嫁接方法进行了改进。选用试管苗的下胚轴进行嫁接，不需消毒，也不要蜡封茎段两端，只要切取茎段后嫁接，用透明塑料管固定，放入培养基中，使其上端与接穗培养基接触，下端与砧木培养基接触，培养皿周围用封口膜封严，做好标记即可。嫁接方法可依材料的不同而不同。当接穗和砧木粗细相当时，可将下胚轴从中间横切为两段后再拼接在一起（如黄瓜自体嫁接，图 2A）；当接穗和砧木粗细不一致时，可先将接穗下端削成楔形，再切取砧木并在其上端从一边避开空腔竖切一刀（如黄瓜/南瓜，图 2B）或从中间竖切一刀（如黄瓜/绿豆，图 2C）。将楔形接穗插入砧木切口后用塑料管固定。研究表明，经过改进的离体茎段嫁接系统，嫁接过程简单且不存在材料污染（卢善发等，1996）。

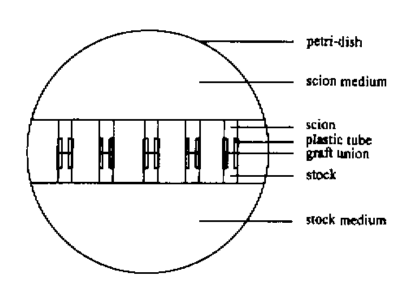


图1　离体茎段嫁接系统

Fig.1　1 System of explanted internode grafting

petri－dish. 培养皿; scion medium. 接穗培养基; scion. 接穗; plastic tube. 塑料管; graft union. 嫁接接合部; stock. 砧木; stock medium. 砧木培养基。

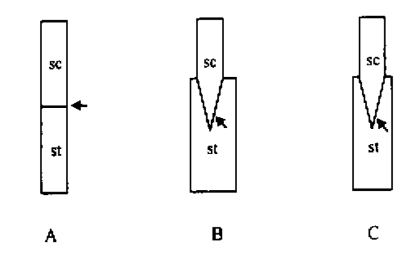


图2　嫁接方法

A. 黄瓜自体嫁接; B. 黄瓜/黑籽南瓜异体嫁接; C. 黄瓜/绿豆异体嫁接。sc. 接穗; st. 砧木; 箭头示嫁接接合部。

Fig.2　Methods for grafting

Method A for cucumber autografting. Method B for cucumber/black－seed pumpkin heterografting. Method C for cucumber/green gram heterografting. sc. scion, st. stock. Arrows indicate graft union.

2　离体茎段嫁接体的发育过程

与整体嫁接类似，离体茎段嫁接体的发育过程由下列步骤组成：在接穗和砧木之间形成隔离层；隔离层两侧薄壁细胞分裂产生愈伤组织；在愈伤组织的特定区域分化产生管状分子和筛分子，其相互连接贯穿嫁接面形成木质部和韧皮部桥；在嫁接面管状分子和筛分子之间分化出形成层，其分裂产生更多的连接嫁接双方的维管组织（Wang, 1992）。

植物嫁接之后，嫁接双方细胞壁物质的沉积和随后的聚合作用使嫁接双方粘连。这种初始粘连与隔离层变化密切相关（Wang, 1992; Wang & Kollmann, 1996; 刘美琴等, 1996）。隔离层由嫁接时用嫁接刀切坏致死的细胞挤靠在一起形成，包含细胞壁、细胞流出的原生质汁液及一些内含物。嫁接初期整体嫁接的隔离层往往分布于整个嫁接面，随着愈伤组织的形成和分裂，隔离层首先在局部区域被突破，然后逐渐扩展，使接穗和砧木细胞能够直接接触。隔离层是一个动态成分（Wang, 1992; 刘美琴等, 1996），木质素、胼胝质、果胶质及蛋白组分都随嫁接时间进程而变化。这些变化与嫁接面两侧未受损伤细胞的细胞学变化相关。嫁接体发育的早期，这些细胞中高尔基体、内质网、线粒体等细胞器大量增加，细胞核和核仁体积增大，细胞质染色强度减弱，淀粉积累以及大量的小泡、多泡体、壁旁体出现（Yang 等, 1992; 杨世杰和娄成后, 1988），呼吸作用加强，细胞内外物质运输加剧，蛋白质合成速度提高。这些细胞产生分泌泡，移向质膜并与之融合，将内含物释放到隔离层中。隔离层的消失主要是由于两侧愈伤组织分裂所形成的生长压力和愈伤组织细胞的吸收所致（Stoddard & Mccully, 1979）。

随着粘连的发生，嫁接面薄壁细胞分裂形成愈伤组织。愈伤组织数量随植物种类和嫁接组合的不同而不同。在亲和性的嫁接组合中，这些愈伤组织细胞能突破隔离层并相互嵌合，在砧木和接穗的愈伤组织细胞间形成贯通次生胞间连丝（Wang, 1992）。次生胞间连丝的形成标志着砧木和接穗共质体的初步连通，此后砧木和接穗间水分和营养物质运输能够较为顺利地进行。次生胞间连丝是嫁接基础理论研究的重大发现之一（Kollmann &

Glockmann, 1985, 1991; Kollmann 等, 1985; Kollmann & Schulz, 1993)。

砧木和接穗间产生愈伤组织后，可由薄壁细胞和愈伤组织细胞直接分化形成管状分子或经过一到几次分裂后形成筛分子和伴胞。亲和性的嫁接组合中，可形成标志嫁接成功的、贯通砧木和接穗的维管束桥（Jefree & Yeoman, 1982; 卢善发等，1996; 卢善发，宋艳茹，1999b），随后在管状分子和筛分子之间产生连接接穗和砧木原有形成层的新形成层，分化产生大量的维管束，至此嫁接体的发育基本完成。最近，在不亲和的嫁接组合中也发现贯通砧木和接穗的维管束桥（Schoning & Kollmann, 1997）。与亲和性嫁接组合不同（Schoning and Kollmann, 1995; Wang and Kollmann, 1996），它们没有正常的输导功能，不能将^{14}C标记的蔗糖从接穗运输到砧木（Schoning & Kollmann, 1997）。

3 离体茎段嫁接体发育的调节

嫁接体发育受激素、温度、水分、光照等多种因子调节，其中激素特别是生长素和细胞分裂素的作用非常显著（Lindsay 等，1974; Warren Wilson, 1982; Warren Wilson and Warren Wilson, 1961; Sachs, 1981）。离体茎段嫁接体发育过程中，外源激素是嫁接成功的必要条件，若培养基中没有激素，则难以形成贯通接穗和砧木的维管束桥（卢善发，宋艳茹，1999b）。嫁接体发育的最佳激素条件随嫁接体的不同而不同。番茄离体茎段嫁接体发育要求在接穗培养基中加 IAA 0.2~2.0 mg/L 和 KT 0.2 mg/L，在砧木培养基中加 KT 0.2 mg/L（Parkinson & Yeoman, 1982）。蚕豆离体茎段嫁接体发育则要求在接穗培养基中加 IAA 1.0 mg/L 和 KT 0.2 mg/L，在砧木培养基中加 KT 0.2 mg/L，在此条件下砧木与接穗间的维管束可直接连通；当激素浓度低时，没有维管束桥分化且易褐变坏死；浓度过高时，只有30%的嫁接体有维管束桥分化，呈分支状分布于茎的棱角处，而其余75%的嫁接体没有维管束桥的分化（刘美琴等，1996）。

我们详细地研究了外源激素对黄瓜试管苗离体茎段嫁接体发育的影响。结果表明，当接穗和砧木培养基中都没有添加植物激素时，嫁接接合部难以产生维管束桥，也难以产生贯通的管状分子。当培养基中添加植物激素时，维管束桥数和贯通的管状分子数随激素浓度和种类的不同而不同。其中在接穗培养基中加 IAA 1.0 mg/L 和 ZT 0.25 mg/L，在砧木培养基中加 ZT 0.25 mg/L（卢善发，宋艳茹，1999b）或在接穗培养基中加 IBA 1.2 mg/L 和 6-BA 0.3 mg/L，在砧木培养基中加 6-BA 0.3 mg/L（卢善发等，1996）时对嫁接体的发育较为有利。在此激素条件下，维管束桥以及贯通接穗和砧木的管状分子的形成时间较早，数目较多。进一步分析嫁接体发育过程中的激素水平，发现维管束桥的分化要求较高的 IAA 水平及 IAA/（Z+ZR）比率（卢善发，宋艳茹，1999a）。最近，我们利用免疫组织化学技术对黄瓜离体茎段嫁接体内 IAA 的动态变化进行了免疫组织化学定位研究，发现接合部胶体金颗粒标记的数量变化与嫁接体发育密切相关（卢善发，2000）。嫁接初期，接穗和砧木间失去共质体联络，负责 IAA 长距离运输的维管束也被切断，生长素的极性运输在嫁接面受阻，接穗一侧胶体金颗粒较多。随着嫁接时间延长，IAA 在接穗一侧累积或通过扩散，穿过隔离层进入砧木一侧，刺激嫁接双方产生愈伤组织，此时嫁接面两侧胶体金颗粒逐渐增加。在维管组织分化，形成贯通接穗和砧木的维管束桥时，累积的胶体金颗粒数达到高峰。而后随嫁接体发育的完成，胶体金颗粒又逐渐减少。可见，植物激素有可能

在嫁接体发育过程中起决定作用。

4 离体茎段嫁接与嫁接亲和性机制研究

嫁接亲和性机制研究是具重要理论和实践意义的生物学课题之一。由于嫁接体的发育受接穗和砧木的解剖结构、生长特性、遗传特征、生理生化性质，病毒或病原体物质的侵染以及光照、温度和水分等外界因子的影响，是一个非常复杂的生物学过程（Ermel 等，1997，1999），从而使嫁接亲和性机制成为一个长期没有解决的理论问题。

离体茎段嫁接系统是研究嫁接亲和性机制的理想系统。该系统除具有与整体嫁接一致的发育过程（卢善发等，1996；Wang & Kollmann，1996）外，还与整体嫁接不同：1）没有根苗系统的影响，不同嫁接组合的源库关系一致。在通过不同嫁接组合接穗和砧木间物质运输的差别来研究嫁接亲和与不亲和现象过程中，可以减少整体嫁接中因组合的不同而引起的源库关系强度的差别进而造成对嫁接亲和与不亲和现象的掩盖（Rachow - Brandt & Kollmann，1992）。利用这一特性，Schoning 和 Kollmann（1995，1997）成功地利用离体嫁接系统比较了番茄和向日葵自体嫁接、蚕豆/向日葵和番茄/马铃薯异体嫁接发育过程中嫁接接合部对蔗糖的输导能力，发现番茄/马铃薯嫁接接合部的韧皮部没有输导功能，是非亲和性嫁接组合。2）环境条件可控。可以通过改变培养基成分来调控嫁接体发育，以研究不同因子在嫁接体发育过程中的作用（卢善发和宋艳茹，1999b；Parkinson & Yeoman，1982；Parkinson 等，1987）。黄瓜/绿豆是不亲和性嫁接组合，整体嫁接时不能形成贯通砧木和接穗的维管束桥。当离体茎段嫁接体培养在含适当浓度激素的培养基中时，接穗和砧木间可形成跨嫁接面的维管束桥。初步表明，利用植物激素克服嫁接不亲和性具有一定的可能性。对这一现象进行深入研究，将为揭示嫁接亲和性机制提供重要的理论依据。

〔参 考 文 献〕

卢善发，2000. 离体茎段嫁接体内 IAA 的免疫组织化学定位〔J〕. 科学通报，45：

卢善发，宋艳茹，1999a. 激素水平与试管苗离体茎段嫁接体维管束桥分化的关系.〔J〕科学通报，44：1422～1425

卢善发，宋艳茹，1999b. 嫁接接合部维管组织分化的激素调节〔J〕. 云南植物研究，21：483～490

卢善发，杨世杰，1995a. 电偶联原理在嫁接基础研究中的应用〔J〕. 植物学报，37：539～543

卢善发，杨世杰，1995b. 砧木与接穗间的电波传递〔J〕. 植物生理学报，21：386～392

卢善发，杨世杰，1996. 电波传递在嫁接基本理论研究中的应用〔J〕. 植物学报，38：362～366

卢善发，唐定台，宋经元，等，1996. 利用植物激素调控嫁接形成的初步研究〔J〕. 植物学报，38：307～311

刘美琴，王幼群，杨世杰，1996. 植物激素对蚕豆离体茎段自体嫁接的影响〔J〕. 园艺学报，23：264～268

杨世杰，娄成后，1988. 嫁接隔离层两侧愈伤组织中的壁旁体〔J〕. 植物学报，30：480～484

Derrick P M，Barker H，1997. Short and long distance spread of potato leafroll luteovirus：effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato〔J〕. *J Gen Virol*，78（Pt 1）：243～251

Ermel F F，Kervella J，Catesson A M，*et al*，1999. Localized graft in incompatibility in pear/quince（*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*）combinations：multivariate analysis of histological data from 5 - month - old grafts〔J〕. *Tree Physiol*，19：645～654

Ermel F F，Poessel J L，Faurobert M，*et al*，1997. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts：a histo - cytological study〔J〕. *Ann Bot*，79：505～515

Hartmann H T，Kester D E，1983. Plant propagation：principle and practices〔M〕. 4th ed. Prentice - Hall，Enhlewood Cliffs

Jeffree C，Yeoman M M，1983. Development of intercellular connection between opposing cells in a graft union〔J〕. *New Phytol*，93：491～509

Kollmann R，Glockmann C，1985. Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa

〔J〕. *Protoplasma*, **124**: 224～235

Kollmann R, Yang S, Glockmann C, 1985. Studies on graft unions. II. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface 〔J〕. *Protoplasma*, **126**: 19～29

Kollmann R, Glockmann C, 1991. Studies on graft unions. III. On the mechnism of secondary plasmodesmata at the graft interface 〔J〕. *Protoplasma*, **165**: 71～85

Kollmann R, Schulz A, 1993. Phloem regeneration. In: Behnke H D, Luttge U, Esser K, et al, Runge M, eds. Progress in Botany 〔M〕, vol. 54. Berlin: Spinger Verlag Berlin Heidelberg, 63～68

Larkin J C, Felsheim R, Das A, 1990. Floral determination in the terminal bud of the short－day plant *Pharbitis nil* 〔J〕. *Dev Biol*, 137: 434～443

Lindsay D W, Yeoman M M, Brown R, 1974. An analysis of the development of the graft union in *Lycopersicon esculentum* 〔J〕. *Ann Bot*, **38**: 639～646

McGurl B, Orosco－Cardenas M, Pearce G, *et al*, 1994. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis 〔J〕. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 9799～9802

Moore R, 1984. A model for graft compatibility－incompatibility in higher plants 〔J〕. *Am J Bot*, **71**: 752～758

Palauqui J C, Elmayan T, Pollien J M, *et al*, 1997. Systemic acquired silencing: transgene－specific post－transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non－silenced scions 〔J〕. *EMBO J*, **16**: 4738～4745

Palauqui J C, Vaucheret H, 1998. Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression 〔J〕. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 9675～9680

Parkinson M, Yeoman M M, 1982. Graft formation in cultured, explanted internodes 〔J〕. *New Phytol*, **107**: 489～498

Parkinson M, Jeffree C E, Yeoman M M, 1987. Incompatibility in cultured explant grafts between members of the *Solanaeae* 〔J〕. *New Phytol*, **107**: 489～498

Rachow－Brandt G, Kollmann R, 1992. Studies on graft unions IV. Assimilate transport and sieve element restitution in homo－ and hetero－grafts 〔J〕. *J Plant Physiol*, **139**: 579～583

Sachs T, 1981. The control of the patterned differentiation of vascular tissue. In: Woolhouse H H, ed. Advances in Botanical Research 〔M〕, vol 9. London: Academic Press Inc, 151～262

Schoning U, Kollmann, 1995. The function of phloem connections in regenerating *in vitro*－grafts 〔J〕. *Bot Acta*, **108**: 56～62

Schoning U, Kollmann, 1997. Phloem translocation in regenerating in vitro－heterografts of different compatibility 〔J〕. *J Exp Bot*, **48**: 289～295

Stoddard F L, Mccully M E, 1979. Histologie of the development of the graft union in pea roots 〔J〕. *Can J Bot*, **57**: 1486～1501

Wang Y Q, 1992. Histologische, cytologische und transport－physiologische untersuchungen an in－vitro－pfropflingen unterschiedlicher kompatibilitaet 〔M〕. Kiel: Aachen Shaker Press

Wang Y Q, Kollmann R, 1996. Vascular differentiation in the graft union of in vitro grafts with different compatibility－structural and functional aspects 〔J〕. *J Plant Physiol*, **147**: 521～533

Warren Wilson P M, 1982. The effect of a grafted bud on vascularization of the petiole in *Phaseolus*, *Datura* and *Lycopersioncon* 〔J〕. *Ann Bot*, **49**: 873～886

Warren Wilson P M, Warren Wilson J, 1961. Cambium formation in wounded *Solanaceous* stems 〔J〕. *Ann Bot*, **25**: 104～115

Wilson C R, Jones R A, 1992. Resistance to phloem transport of potato leafroll virus in potato plants 〔J〕. *J Gen Virol*, **73** (Pt12): 3219～3224

Wintermantel W M, Banerjee N, Oliver J C, *et al*, 1997. Cucumber mosaic virus is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase－mediated resistance 〔J〕. *Virology*, **231**: 248～257

Xoconostle－Cazares B, Xiang Y, Ruiz－Medrano R, *et al*, 1999. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem 〔J〕. *Science*, 283 (5398): 94～98

Yang S, Xiang G, Zhang S, *et al*, 1992. Electrical resistance as a measure of graft union 〔J〕. *J Plant Physiol*, **141**: 98～104

Yeoman M M, Kilpatrick D C, Miedzybrodzka M B, *et al*, 1978. Cellular interactions during graft formation in plants, a recognition phenomenon? 〔J〕 *Symp Soc Exp Biol*, **32**: 139～160